

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



30. Juni 1998

09/424840

REC'D 11 AUG 1998
WIPO PCT

Bescheinigung

Die ASAT AG Applied Science & Technology in Zug/Schweiz hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Rekombinante Antikörper"

am 6. Juni 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 12 N, C 12 P und C 07 K der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 19. Juni 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Zeichen: 197 23 904.8



Brand

PATENTANWÄLTE

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG

POSTFACH 860 320
81635 MÜNCHEN
KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN
TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621
TELEFAX (089) 4 70 50 68
eMail weickmann@compuserve.com

6. Juni 1997

Unser Zeichen:
16824P DE/WWvo

Anmelder:
ASAT AG
Applied Science & Technology
Baarerstrasse 77

6302 Zug
Schweiz



Rekombinante Antikörper

Rekombinante Antikörper

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane Autoantikörper gegen Blutplättchen-Membranproteine kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von Krankheiten.

10

Autoimmun-thrombozytopenische Purpura (AITP) ist eine Immunkrankheit, die durch eine geringe Blutplättchenzahl bei normaler oder gesteigerter Megakaryozytopoiese definiert ist. Aufgrund des Vorhandenseins von Anti-Plättchen-Autoantikörpern findet eine verstärkte Zerstörung von Plättchen im reticuloendothelialen System (Milz, Leber, Knochenmark) statt. Diese Autoantikörper, die in etwa 75% der AITP Patienten nachgewiesen werden können, sind überwiegend gegen die Plättchenmembran-Glykoproteine (GP) IIb/IIIa und Ib/IX gerichtet. In einem einzigen Patienten können mehrere verschiedene Auto-Antikörper-Spezifitäten gefunden werden (vgl. z.B. Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250; Kiefel et al., Br. J. Haematol. 79 (1991), 256-262; McMillan et al., Blood 70 (1987), 1040 und Fujisawa et al., Blood 79 (1991); 1441). Die Charakterisierung von Bindeepitopen und die Ermittlung der pathogenetischen Signifikanz der Autoantikörper bleibt jedoch schwierig aufgrund der beschränkten Menge an Autoantikörpern, die aus AITP Patienten erhältlich sind. Unter Verwendung der Hybridomatechnik konnten nur wenige humane monoklonale Antikörper aus Lymphozyten von AITP Patienten erhalten werden, die mit GPIIb/IIIa reagieren (Kunicki et al., Hum. Antibodies Hybridomas 1 (1990), 83-95).

30

Auch bei gesunden Personen wurde das Auftreten natürlicher Autoantikörper gegen verschiedene Selbstantigene berichtet, beispielsweise

- gegen intrazelluläre und zytoskelettale Komponenten humaner Plättchen (Guilbert et al., J. Immunol. 128 (1982), 2779-2787; Hurez et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 783-789 und Pfueller et al., Clin. Exp. Immunol. 79 (1990), 367-373). Einige dieser im Serum gesunder Personen beobachteten
- 5 Autoantikörper können auch gegen Plättchenmembranproteine gerichtet sein (Souberbielle, Eur. J. Haematol. 56 (1996), 178-180). Die Rolle dieser natürlichen Autoantikörper sowie ihre Beziehung zu Krankheits-assoziierten Autoantikörpern ist jedoch noch unbekannt.
- 10 Zur Behandlung von AITP können Corticosteroide eingesetzt werden. Etwa die Hälfte der Patienten reagiert auf eine Verabreichung von Prednison innerhalb von 4 Wochen, Langzeitremissionen werden jedoch nur selten gefunden. Bei Patienten, die starke Blutungen oder extrem geringe Plätt-
- 15 Dosen von intravenösem Immunglobulin (IVIgG) empfohlen. Nach dieser Behandlung folgt ein schneller, aber üblicherweise nur vorübergehender Anstieg der Plättchenzahl bei den meisten Patienten. Die Wirkmechanismen von Corticosteroiden sowie von IVIgG bei der Behandlung der AITP sind noch unbekannt. Durch Untersuchungen von Berchtold et al., (Blood 74
- 20 (1989), 2414-2417 und Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250) ist bekannt, daß die Bindung von Autoantikörpern an Plättchen-Glykoproteine durch antiidiotypische Antikörper in IVIgG gehemmt werden kann.
- 25 Das der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende Problem besteht darin, neue DNA Sequenzen zu identifizieren, welche für die Bindung von Autoantikörpern an GPIIb/IIIa verantwortlich sind. Auf diese Weise können neue pharmazeutische Präparate bereitgestellt werden, welche zur Verbesserung der Diagnose und Therapie von AITP eingesetzt werden können.
- 30 Die Identifizierung von Bindesequenzen aus Autoantikörpern gelang überraschenderweise nach Herstellung einer kombinatorischen Phagemid-

Displaybibliothek von schweren und leichten Ketten humaner Antikörper unter Verwendung peripherer zirkulierender B-Zellen eines gesunden humanen Spenders. Nach Präsentation humaner schwerer und leichter Antikörper Fab-Fragmente an der Oberfläche des filamentösen Phagen M13 konnten Phagen-Klone identifiziert werden, welche eine spezifische Bindung an GPIIb/IIIa zeigen.

Hierzu wurde die Phagemid-Bibliothek aufeinanderfolgend mit thrombasthenischen Plättchen ohne GPIIb/IIIa (negative Selektion) und normalen Plättchen (positive Selektion) in Kontakt gebracht. Nach mehreren Runden der Selektion und Amplifikation durch Infektion von E.coli wurden 23 Klone erhalten, die an den GPIIb/IIIa Komplex binden können. Inhibierungsstudien unter Verwendung Pools monoklonaler Antikörper gegen GPIIb/IIIa ergaben zwei Gruppen von Klonen: Beide Gruppen wurden durch monoklonale Antikörper, die spezifisch für den GPIIb/IIIa Komplex waren, inhibiert, und eine Gruppe auch durch einen GPIIb spezifischen monoklonalen Antikörper. Diese Befunde wurden durch DNA-Analyse der Klone bestätigt, die das Vorhandensein von 2 unterschiedlichen Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klonen ergab. Diese Ergebnisse zeigen, daß 2 GPIIb/IIIa spezifische Phagen-Klone, d.h. Autoantikörper, aus dem Genom einer gesunden Person kloniert werden können und daß diese Klone Konformationsepitope des GPIIb/IIIa Komplexes erkennen können. Durch Inhibierungsstudien wurde weiterhin festgestellt, daß beide Phagen-Klone die Bindung von Plättchen-assoziierten Autoantikörpern aus Patienten mit AITP an gereinigtes GPIIb/IIIa hemmen und somit vermutlich AITP-assoziierte Epitope von GPIIb/IIIa erkennen. Da die Phagen-Klone die Antigenbindesequenzen natürlicher Autoantikörper enthalten, die aus dem Genom einer gesunden Person stammen, kann dieser Befund zu neuen Erkenntnissen über den Ursprung Plättchen-assoziiierter Autoantikörper in AITP führen.

30

Darüber hinaus ist es unter Verwendung der erfindungsgemäßen Phagen-Klone möglich, rekombinante antiidiotypische Antikörper gegen Anti-

GP1Ib/IIIa Autoantikörper zu erzeugen, wobei die Anti-GP1Ib/IIIa Phagen-Klone als Antigen verwendet werden. Die auf diese Weise erhältlichen rekombinanten antiidiotypischen Antikörper stellen eine interessante klinische Alternative zur Verwendung von IVIgG dar.

5

Die Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen der identifizierten Phagen-Klone sind in den Sequenzprotokollen SEQ ID No.1 bis 8 dargestellt.

10 Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- 15 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V L P F D P I S M D V (I)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
A L G S W G G W D H Y M D V (II)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 20 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert und
- (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Binde-fähigkeit an GP1Ib/IIIa kodiert.

25

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine CDR1-Region ausgewählt aus

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G Y S W R (III)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S Y A M H (IV)

kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90 % zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt:

- 10 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
DISYSGSTKYKPSLR S (V)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
VISYDGSNKYYADSVKG (VI)
15 kodierenden Nukleotidsequenz und
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

20 Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- 25 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
ATWDDGLNGPV (VII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
AAWDDSLNGWV (VIII)
30 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von

mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert und

- (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

5

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR1-Region ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

S G S S S N I R S N P V S (IX)

10 kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

S G S S S N I G S N T V N (X)

kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit

15

einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise

20

weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

G S H Q R P S (XI)

kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

25 S N N Q R P S (XII)

kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit

einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)

30

kodiert.

Unter dem Begriff "funktionelles Derivat einer Kette eines humanen Antikörpers" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid zu verstehen, das mindestens eine CDR3-Region der schweren oder/und leichten Kette wie vorstehend definiert umfaßt und zusammen mit der
5 jeweiligen komplementären Kette des humanen Antikörpers (oder einem Derivat einer solchen Kette) ein Antikörperderivat bilden kann, das eine äquivalente Erkennungsspezifität für ein Antigen wie der nicht derivatisierte Antikörper besitzt. Vorzugsweise weist ein derartiges Antikörperderivat eine Bindungskonstante von mindestens 10^{-6} l/mol, vorzugsweise von mindestens 10^{-8} l/mol für das jeweilige Antigen auf.
10

Die Herstellung funktioneller Derivate von Ketten eines humanen Antikörpers kann beispielsweise durch Deletion, Substitution oder/und Insertion von Abschnitten des für das jeweilige Polypeptid kodierenden Gens durch re-
15 kombinante DNA-Techniken erfolgen.

Besonders bevorzugte funktionelle Derivate von Antikörperketten oder Antikörper sind Einzelkettenantikörper, die beispielsweise aus den variablen Domänen der H- und L-Kette sowie gegebenenfalls einer konstanten
20 Domäne zusammengesetzt sein können. Die Herstellung solcher Konstrukte ist bei Hoogenboom et al., Immunol. Rev. 130 (1992), 41-68; Barbas III, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119 und Plückthun, Immunochemistry (1994), Marcel Dekker Inc., Kapitel 9, 210-235 beschrieben.
25

Unter dem Begriff "äquivalente Bindefähigkeit" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine gleiche Bindeaffinität oder/und Spezifität, d.h. Epitoperkennung wie in den konkret offenbarten Sequenzen zu verstehen.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein prokaryontischer Vektor oder ein eukaryontischer

Vektor sein. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind Plasmide, Cosmide und Bakteriophagen. Derartige Vektoren sind beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Eddition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, in den Kapiteln 1 bis 4 ausführlich
5 beschrieben. Vorzugsweise ist ein prokaryontischer Vektor ein Plasmid oder ein Phage.

Andererseits kann der Vektor auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefevektor, ein Insektenvektor (Baculovirus) oder ein Säugervektor
10 (Plasmidvektor oder viraler Vektor). Beispiele für eukaryontische Vektoren sind bei Sambrook et al., supra, Kapitel 16 und Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung für die Gentechnologie (1985), VCH Verlagsgesellschaft insbesondere Kapitel 5, 8 und 10, beschrieben.

15 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure exprimiert, oder eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann eine prokaryontische Zelle (z.B. eine gram-negative Bakterienzelle, insbesondere E.coli) oder eine eukaryontische
20 Zelle (z.B. eine Hefe-, Pflanzen- oder Säugierzelle) sein. Beispiele für geeignete Zellen und Verfahren zum Einführen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in derartige Zellen finden sich den obigen Literaturstellen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, das
25 von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert ist, insbesondere ein rekombinantes Polypeptid. Besonders bevorzugt enthält das Polypeptid die variable Domäne der H- oder/und L-Kette eines humanen Antikörpers.

Besonders bevorzugt ist ein Polypeptid, das Antikörpereigenschaften
30 aufweist und aus einer schweren Kette oder einem funktionellen Derivat davon sowie aus einer leichten Kette oder einem funktionellen Derivat davon

als Untereinheiten aufgebaut ist. Das Polypeptid kann aus zwei separaten Ketten zusammengesetzt sein oder als Einzelkettenpolypeptid vorliegen.

5 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid, der gegen ein für die Erkennung des Antigens verantwortliche Region des Polypeptids gerichtet ist. Dieser Antikörper kann ein polyklonales Antiserum, ein monoklonaler Antikörper oder ein Fragment eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers (z.B. ein Fab-, F(ab)₂-, Fab'- oder F(ab')₂ Fragment) sein. Vorzugsweise ist der
10 Antikörper gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten Antikörperkette des erfindungsgemäßen Polypeptids oder einen Bereich davon gerichtet. Derartige Antikörper können nach an sich bekannten Methoden durch Immunisierung eines Versuchstiers mit einem Peptid oder Polypeptid, welches eine erfindungsgemäße CDR3-Region enthält, und
15 Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antikörper aus dem Versuchstier erhalten werden. Weiterhin können monoklonale Antikörper durch Fusion einer Antikörper-produzierenden B-Zelle des Versuchstiers mit einer Leukämiezelle nach der Methode von Köhler und Milstein oder einer Weiterentwicklung davon erhalten werden. Darüber hinaus können
20 rekombinante Antikörper, die gegen die CDR3-Region des erfindungsgemäßen Polypeptids gerichtet sind, auch durch Musterung einer geeigneten Phagemid-Bibliothek, z.B. einer Phageimid-Bibliothek aus einem gesunden humanen Spender, erhalten werden, wobei als Antigen ein erfindungsgemäßes Polypeptid verwendet wird.

25

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Nukleinsäure, einen Vektor, ein Polypeptid, einen Antikörper oder eine Zelle wie zuvor genannt, als aktive Komponente, gegebenenfalls zusammen mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-,
30 Zusatz- oder Trägerstoffe enthält.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels eingesetzt werden. Beispiele für diagnostischen Anwendungen sind die Diagnose von AITP oder einer Prädisposition für AITP. Eine weitere bevorzugte diagnostische Anwendung ist die Überwachung des Krankheitsverlaufs bei AITP.

Der Einsatz der pharmazeutischen Zusammensetzung als diagnostisches Mittel kann beispielsweise den Nachweis einer B-Zellsubpopulation umfassen, welche ein erfindungsgemäßen Polypeptid als Antikörper exprimiert. Der Nachweis dieses Antikörpers kann beispielsweise auf Nukleinsäureebene, z.B. durch einen Nukleinsäure-Hybridisierungs-Assay gegebenfalls mit vorgeschalteter Amplifikation erfolgen. Andererseits kann der Nachweis auch auf Proteinebene durch einen Immunoassay unter Verwendung von spezifisch mit dem Polypeptid reagierenden Antigenen oder Antikörpern erfolgen.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung auch auf therapeutischem Gebiet angewandt werden, insbesondere zur Prävention oder Therapie von AITP. Diese therapeutische Anwendung kann beispielsweise darauf beruhen, daß eine Stimulierung der Produktion von Anti-Autoantikörpern erfolgt. Hierzu kann beispielsweise das erfindungsgemäße Polypeptid einem Patienten verabreicht werden, wodurch die Bildung von antiidiotypischen Antikörpern hervorgerufen oder/und stimuliert wird. Diese Verabreichung kann dabei nach üblichen Immunisierungsprotokollen (Fox et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 279 (1996), 1000-1008; Whittum-Hudson et al., Nat. Med. 2 (1996), 1116-1121; Jardieu, Curr. Opin. Immunol. 7 (1995), 779-782) erfolgen. Andererseits kann die Expression von Antikörpergenen spezifisch durch Verabreichung geeigneter Antisense-Nukleinsäuren gehemmt werden.

Weiterhin wird die Erfindung durch nachfolgende Beispiele und Sequenzprotokolle erläutert. Es zeigen:

- 5
10
15
20
25
30
- SEQ ID No. 1 Die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-
gemäßen Antikörpers (Phagemidklon PDG7), wobei
Framework-Region (FR)1 von bp 1-90, Komplement-
bestimmende Region (CDR)1 von bp 91-105, FR2 von
bp 106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-
291, CDR3 von bp 292-324 und FR4 von bp 325-357
reicht,
- SEQ ID No. 2 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 1 darge-
stellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30,
CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von
A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-
108 und FR4 von A.S. 109-119 reicht,
- SEQ ID No. 3 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG7), wobei FR1
von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-
144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261,
CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,
- SEQ ID No. 4 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 3 angege-
benen Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20,
CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von
A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98
und FR4 von A.S. 99-11 reicht,
- SEQ ID No. 5 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG13), wobei
FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-109, FR2 von bp
106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294,
CDR3 von bp 295-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,

SEQ ID No. 6 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 5 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-112 und FR4 von A.S. 113-123 reicht,

5

SEQ ID No. 7 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PGD13), wobei FR1 von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261, CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,

10

SEQ ID No. 8 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 7 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98 und FR4 von A.S. 99-111 reicht.

15

Beispiele

20

1. Gewinnung von Autoantikörpern

Autoantikörper von 12 Patienten mit AITP (8 mit primärer AITP, 3 mit AITP assoziiert mit SLE, 1 mit AITP assoziiert mit Sjögren's Syndrom) wurden durch Inkubation von Patientenplasma über Nacht mit gereinigtem GPIIb/IIIa bei 4°C und anschließende Elution in 0,2 mol/l Glycin und 0,15 mol/l NaCl pH 2,5 für 15 min bei Raumtemperatur erhalten. Nach Zentrifugation für 30 min bei 100.000 g wurde der Überstand mit 1 mol/l Tris-HCl neutralisiert und über Nacht gegen Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) dialysiert.

25

30

Zum Zeitpunkt der Plasmaentnahme waren alle Patienten thrombozytopenisch (Plättchenzahl $< 150 \times 10^9/l$) und hatten normale oder vergrößerte

Megakaryozyten im Knochenmark und waren frei von anderen nachweisbaren Formen der Immunthrombozytopenie.

2. Gewinnung gereinigter Antigene

5

Als Antigene wurden gereinigtes GPIIb/IIIa, ein zytoplasmatisches Fragment von GPIIIa (Aminosäuren 721-744) und ein extrazelluläres Fragment von GPIIIa (Aminosäuren 468-690) verwendet (Beardsley, Blut 59 (1989), 47-51 und Phillips et al., Methods Enzymol. 215 (1992), 244-263).

10

3. Gewinnung von Plättchen zum Panning und Immunoblotting

15

Aus EDTA-antikoagulierten Blutproben gesunder humander Spender wurde Plättchen-angereichertes Plasma durch differenzielle Zentrifugation hergestellt. Die Plättchen wurden durch Zentrifugation bei 2000 g für 15 min isoliert, sechsmal in Zitronensäurepuffer (pH 6,2) mit 50 mmol/l Natriumcitrat, 100 mmol/l NaCl und 125 mmol/l Dextrose gewaschen und schließlich im gleichen Puffer resuspendiert.

20

Thrombasthenische Plättchen wurden aus einem 14 Jahre alten an Thrombasthenie Glanzmann Typ I erkrankten Jungen unter Verwendung des gleichen Anreicherungsprotokolls erhalten.

4. Monoklonale Antikörper

25

30

Es wurden murine monoklonale Antikörper verwendet, welche die komplexierte Form von GPIIb/IIIa erkennen, sowie Antikörper, die selektiv GPIIb oder GPIIIa erkennen. Diese Antikörper wurden mit üblichen Immunisierungsprotokollen unter Verwendung der entsprechenden Antigene gewonnen und sind nicht AITP-assoziiert. Die Gewinnung solcher Antikörper ist bei Kouns et al. (J. Biol. Chem. 267 (1992), 18844-18851), Steiner et

al. (Biochim. Biophys. Acta 1119 (1992), 12-21) und Häring et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 4837-4841) beschrieben.

5. Phagemid-Bibliothek

5

Eine kombinatorische Fab-Bibliothek wurde nach der von Vogel et al. (Eur. J. Immunol. 24 (1994), 1200-1207) beschriebenen Methode hergestellt, wobei periphere Blutlymphozyten aus einem gesunden präimmunisierten humanen Spender verwendet wurden. Alle Enzyme und Oligonukleotide wurden von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland) mit Ausnahme der Taq Polymerase (Perkin Elmer, NJ, USA) bezogen. Die Primer für die PCR-Amplifikation der H-und L-Ketten der Fab-Moleküle, der VCSM13 Helferphage und der Escherichia coli Stamm XL-Blue wurden von Stratacyte (La Jolla, CA, USA) bezogen. Das Phagemid pComb3 wurde vom
10
Scripps Research Institute (La Jolla, CA, USA) bezogen. Die Klonierung, die Transformation in XL-Blue-Zellen und die Herstellung von Phabs erfolgte wie von Barbas III und Lerner, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119) beschrieben. Die Phabs wurden mit 4% (w/v) Polyethylenglykol 8000 und 3% (w/v) NaCl präzipitiert und in PBS pH 7,4 resuspendiert. Die resultierende Expressionsbibliothek enthält 1×10^7 Spezifitäten.
15
20

6. Isolierung von GPIIb/IIIa-spezifischen Phabs

GPIIb/IIIa-spezifische Phabs wurden durch insgesamt 5 Runden einer Affinitätsselektion ("Panning") hergestellt. Nach Präabsorption (negative Selektion) mit 5×10^7 thrombasthenischen Plättchen wurden die Phabs mit 10^8 normalen Plättchen für 45 min inkubiert (positive Selektion). Gebundene Phabs wurden dann mit 0,05 mol/l Natriumcitrat pH 2,5 eluiert und mit 1 mol/l Tris-Puffer neutralisiert. Nach jeder "Panning"-Runde wurde die Anreicherung von GPIIb/IIIa spezifischen Phabs durch Titration der
25
30
Phagenkolonie-bildenden Einheiten verfolgt. Nach fünf Selektionsrunden

wurde eine Anreicherung der eluierten Phabs um den Faktor von mehr als 100 gefunden.

Der nach der vierten Selektionsrunde erhaltene Pool von Phabs wurde näher
5 auf seine GPIIb/IIIa Spezifität analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone
zufällig ausgewählt und ihre Bindespezifität in einem Immunodot-Assay
ermittelt. 1 μ l normale und thrombasthenische Plättchen (10^9 ml) sowie
gereinigtes GPIIb/IIIa (500 μ g/ml) wurden auf Nitrozellulosestreifen (Millipore
Corporation, Bedford, MA, USA) getropft. Die Streifen wurden in TBS mit
10 0,15% Casein (TBS-Casein) blockiert und dann über Nacht mit den in TBS-
Casein verdünnten Phabs inkubiert. Nach drei Waschungen mit TBS-0,1%
Tween 20 (TBS-Tween) wurden die gebundenen Phabs mit 4-Chlor-1- α -
naphthol (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Inkubation mit Mee-
rettichperoxidase-konjugiertem polyklonalem Kaninchen-Anti-Phage-
15 Antikörper (Vogel et al., supra) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein nach-
gewiesen.

Die Bindung von Phabs an Plättchen und gereinigtes GPIIb/IIIa wurde auch
nach Denaturierung der Proteine durch Erhitzen (70°C) oder durch
20 Säurebehandlung (pH 2 mit 0,5 N HCl) vor dem Auftropfen getestet.

Von den 40 zufällig ausgewählten Klonen reagierten 23 (57,5%) mit
GPIIb/IIIa, während 17 keine Bindung zeigten. Nach Denaturierung des
Antigens durch Hitze oder pH 2 vor der Inkubation wurde keine Bindung von
25 Anti-GPIIb/IIIa an Phabs beobachtet, wodurch gezeigt wird, daß intaktes
GPIIb/IIIa für die Phab-Bindung notwendig ist. Fab-Bestimmung an negativen
Phabs zeigte keine Fab-Moleküle bei 15 Klonen (88 %). Die zwei Fab-
positiven Klone ohne Bindung an GPIIb/IIIa könnten eine geringe Bindeaffini-
tät für GPIIb/IIIa aufweisen.

7. Fab Analyse

Zum Test der positiven Phabs auf kappa (κ), lambda (λ) und Fd-Ketten wurden die Anti-GPIIb/IIIa Phabs auf Nitrozellulose getropft. Die Filter wurden 4 Stunden lang mit Peroxidase-markiertem Maus-anti-Human- λ -, - κ - (The Binding Site Limited, Birmingham, England) und -Fd-Antikörper (aus der Myelomazelllinie HP6045, ATCC1757, Rockville, MD, USA) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein inkubiert und mit Chemielumineszenz (ECL, Amersham, Schweiz, Zürich, Schweiz) entwickelt. Ein Test von 15 zufällig ausgewählten Anti-GPIIb/IIIa Fab-Klonen auf κ , λ und Fd-Ketten ergab das Vorhandensein einer Fd-Kette in 12 Klonen (80%) und der λ -Kette in allen Klonen.

Eine quantitative Bestimmung der Fab-Bindung an GPIIb/IIIa auf Plättchen erfolgt durch Präinkubation gepoolter Phabs mit Plättchen in verschiedenen Konzentrationen. Der Überstand wurde dann durch ein Immunodotverfahren analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß 1 bis 3×10^4 Phabs pro Plättchen binden. Dies weist darauf hin, daß ungefähr 10 bis 50 % der GPIIb/IIIa Moleküle pro Plättchen durch Phabs besetzt werden können.

20

8. Charakterisierung der Phab-Bindeepitope

Die Epitopspezifität von Phabs wurde durch einen Inhibitionstest unter Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper (siehe Punkt 4) bestimmt. 1 μ l aufgetaute normale und thrombasthenische Plättchen (10^9 /ml), gereinigtes GPIIb/IIIa (500μ g/ml), ein Peptidfragment von GPIIIa (Aminosäuren 468-690, 500μ g/ml) und der cytoplasmatische Abschnitt von GPIIb/IIIa (500μ g/ml) wurden jeweils in Doppelansätzen auf Nitrozellulosestreifen aufgetropft. Nach der Blockierung wurden die Phab-Klone (0,4 μ g/ml Fab) über Nacht mit oder ohne monoklonalen Antikörper (1 μ g/ml) inkubiert. Die gebundenen Phabs wurden durch Peroxidase-markierten Anti-PHage-Antikörper und 4-Chlor-1- α -naphthol nachgewiesen.

30

Bei diesen Untersuchungen wurden 2 Gruppen von Phabklonen identifiziert. Gruppe A (5 Klone) wurde mäßig durch einen Pool aller Antikörper, aber stark durch GPIIb/IIIa-Komplex-spezifische Antikörper inhibiert. Anti-GPIIb Antikörper hatten keinen Effekt. Gruppe B (10 Klone) wurde vollständig
5 durch den Pool aller Antikörper, aber weniger durch den komplexspezifischen Antikörper und auch durch den IIb spezifischen Antikörper inhibiert. Keine Gruppe zeigte Reaktion mit GPIIIa spezifischen Antikörpern. Gleiche Ergebnisse wurden bei Verwendung von Plättchen oder gereinigtem GPIIb/IIIa als Antigen erhalten. Es wurde keine Phab-Bindung an das
10 cytoplasmatische Peptid oder das extrazelluläre Fragment von GPIIIa gefunden.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Hemmung der Phab-Bindung (Mittelwert \pm SD in %)				
Pools monoklonaler Antikörper für Inhibition	Gruppe A Phab Klone (n = 5)		Gruppe B Phab Klone (n = 10)	
	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa
(1) Anti-GPIIb	0	0	49,1 \pm 5,9	49,4 \pm 9,2
(2) Anti-GPIIIa	0	0	0	0
(3) Anti GPIIb/IIIa-Komplex	77,8 \pm 2,9	43,6 \pm 2,1	58,6 \pm 4,4	45,5 \pm 8,0
Pool aller Antikörper (1)-(3)	47,6 \pm 7,7	33,0 \pm 10,8	95,9 \pm 2,7	97,5 \pm 7,5

9. Inhibierungsuntersuchungen

Die Blockierung der Bindung von Autoantikörpern aus Patienten an GPIIb/IIIa durch die gefundenen anti-GPIIb/IIIa Phabs wurde durch Inhibierungsuntersuchungen ermittelt. Hierzu wurden zwei der wie zuvor beschrieben identifizierten Phabklone (PDG16, PDG31) verwendet.

Serielle Verdünnungen von 1:3 bis 1:1000 der eluierten Autoantikörper aus Patienten wurden auf die Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa analysiert. Hierzu wurde ein Immunodotassay durchgeführt. 100 ng gereinigtes GPIIb/IIIa wurde in jeweils dreifachen Ansätzen auf Nitrozellulosestreifen getropft und die Filter mit TBS-Casein blockiert. Zur Blockierung der AITP Autoantikörper-Bindung an GPIIb/IIIa durch Phabs wurden die Streifen 1 h lang mit 10^{11} Phabs und anschließend 4 h lang mit AITP Autoantikörpern in variablen Verdünnungen inkubiert. Gebundene Autoantikörper wurden durch Peroxidase-markierten Anti-human-IgG-Fc Antikörper und ECL nachgewiesen.

Die Bindung von Autoantikörpern aus 8 AITP Patienten wurde durch Anti-GPIIb/IIIa Phabs inhibiert. Der Inhibierungsbereich war 10 bis 46 %, 32 bis 60 % und 20 bis 67 % für PTG16, PTG31 bzw. den Pool der beiden Phabs. Die Bindung von Autoantikörpern aus 4 AITP Patienten wurde durch diese Phabs nicht verändert. In beiden Gruppen waren Autoantikörper von Patienten mit primärer und krankheitsassoziierter AITP.

Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

	Hemmung der Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa durch (%)		
AITP-Patient	Phab-Klon PDG16	Phab-Klon PDG31	Pool beider Phab Klone
WS16	13	19	40
WS37	14	20	36
KC	24	22	28
KK	22	22	40
KP	10	36	60
WS2	25	55	65
KS	60	56	64
KL	0	15	10
KG	0	0	0
KM	0	0	0
KE	0	0	0
KR	0	0	0

10. DNA Sequenzanalyse

20 Plasmid DNA wurde aus vier Phabklonen der Gruppe A und 4 Klonen der Gruppe mit dem Nukleobond® AX Reinigungskit PC 20 (Macherey-Nagel AG, Oensingen, Schweiz) gereinigt.

Die Nukleinsäuresequenzierung erfolgte auf einen ABI373A Sequenziersystem unter Verwendung eines PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit. Die Primer wurden von Microsynth, Balgach, Schweiz bezogen. Zur Sequenzierung der H Kette wurden folgende Primer verwendet: Chy1 (5'-CGC TGT GCC CCC AGA GGT-3') und PCH (5'-GGC CGC AAA TTC TAT TTC AAG G-3'): Zur Sequenzierung der L-Kette wurden folgende Primer verwendet: C_l (5'-GAG ACA CAC CAG TGT GGC-3'), C_k (5'-CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3') und PCL(5'-CTA AAC TAG CTA GTC TCC-3'). Die von der DNA Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit der GenEMBL-Genbank verglichen und Stammlinien VH und V_λ Familien zugeordnet.

Die VH und V_λ Nukleotidsequenzen der 4 Phabklone jeder Gruppe (Gruppe A: PDG7, PDG8, PDG10, PDG16; Gruppe B: PDG13, PDG17, PDG31, PTG37) wurden durch automatisierte Sequenzierung analysiert und mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen verglichen (Tabellen 3 und 4). Innerhalb jeder Gruppe war 100 % Homologie in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der H- und L-Ketten. Im Gegensatz dazu war die Homologie zwischen Gruppe A und B nur 36,9 % für die H-Kette und 81,9% für die L-Ketten-Aminosäuresequenzen.

In der H-Kette zeigen Klone der Gruppe A den höchsten Grad an Sequenzidentität mit dem Stammlinien VH4.11 der V_H4 Familie (Sanz, et al. EMBO J. 8 (1989), 3741-3748). Es gab 7 Aminosäureunterschiede in der Frameworkregion (FR) und 8 in der Komplement-bestimmenden Region (CDR). Klone der Gruppe B unterschieden sich von der am meisten homologen Stammliniensequenz 1.9III der V_H3-Familie (Berman et al., EMBO J. 7 (1988), 727-738) durch vier Aminosäuren in FR und eine in CDR.

In der L-Kette zeigten die Klone der Gruppe A und B die höchste Homologie zu der Stammliniensequenz der DPL2 der V_λ I Familie (Williams und Winter, Eur. J. Immunol. 23 (1993), 1456). Es gab neun Aminosäureun-

terschiede in FR und zehn in CDR für Klone der Gruppe A und einen in FR und zwei in CDR für Klone der Gruppe B. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3

A. Schwere Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VH4.11	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS	SYWS	WIRQPGKGLEWIG	YIYYSGSTNYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	VLPFDPI SHDV	WGKGTITVTVSS
PDG7	--K-L-----N-----R-----	G-S-R	--S-----	D-S-----K-K--R-	---L-----	VLPFDPI SHDV	WGKGTITVTVSS
PDG8	-----	-----	-----	-----	-----	VLPFDPI SHDV	WGKGTITVTV
PDG10	-----	-----	-----	-----	-----	VLPFDPI SHDV	WGKGTITVTV
PDG16	-----	-----	-----	-----	-----	VLPFDPI SHDV	WGKGTITVTV
1.9111	QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFS	SYGMII	WVRQAPGKGLEWVA	VISYDGSNKYVADSVKG	RTTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	ALGSMGSGWHDIIYMDV	WGKGTITVTVSS
PDG13	--K-L-----	--A--	-----	-----	--A-----	ALGSMGSGWHDIIYMDV	WGKGTITVTVSS
PDG17	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSMGSGWHDIIYMDV	WGKGTITVTVSS
PDG31	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSMGSGWHDIIYMDV	WGKGTITVTVSS
PDG37	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSMGSGWHDIIYMDV	WGKGTITVTVSS
M85255	--Q-V-----	-----	-----	-----	--T-----	DRPIARWYTGCHDV	WGQGTITVTVSS

B. Leichte Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DPL2	VLTPPPSASGTRGQRTVISC	SGSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIY	SNNQRP	GVPDRFSGSKSGTSASLASLQSEDEADYYC	AAMDSSLNG	FGGGTKLTIVLSQP
PDG7	-V-----W-----	-----R--P-S	--H-V-----F	GSII-----	-----R--G-AG--	-T--G--PV	FGGGTKLTIVLSQP
PDG8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTIVLSQP
PDG10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTIVLSQP
PDG16	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTIVLSQP
DPL2	VLTPPPSASGTRGQRTVISC	SGSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIY	SNNQRP	GVPDRFSGSKSGTSASLASLQSEDEADYYC	AAMDSSLNG	FGGGTKLTIVLSQP
PDG13	-V-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTIVLSQP
PDG17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTIVLSQP
PDG31	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTIVLSQP
PDG37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTIVLSQP

FR: framework-Region; CDR: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (VH4.11; 1.9111; DPL2) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die abgeleitete Aminosäuresequenz für die am nächsten verwandte veröffentlichte Stammlinien-Gensequenz dar. Striche bedeuten Identität. M85255 bezieht sich auf die EMPL/GenBank Kennzeichnungsnummer und bedeutet die abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen Anti-GPIIb-Autoantikörpers 2E7 (Kunicki et al., J. Autoimmun. 4 (1991), 433-446). Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVK) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

Tabelle 4 zeigt die Zuordnung von Klonen der Gruppe A und B zu bekannten Stammlinien V-Gensequenzen nach der Aminosäurehomologie

5

10

15

PDG- Phab- Klone	Schwere Kette			Leichte Kette		
	V _H Familie	Stamm- liniengen	Homo- logie (%)	V _L Fa- milie	Stamm- liniengen	Homo- logie (%)
Gruppe A: 7,8, 10, 16	V _H 4	V _H 4.11	84,3	V _L I	DPL2	81,4
Gruppe B: 13, 17,31, 37	V _H 3	1,9III	95,1	V _L I	DPL2	97,1

Ansprüche

1. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers,
5 ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:
- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V L P F D P I S M D V (I)
10 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
A L G S W G G W D H Y M D V (II)
15 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäurese-
quenz aus (a) oder (b) kodiert und
- 20 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, weiterhin umfassend eine CDR1-
Region ausgewählt aus:
- 25 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G Y S W R (III)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S Y A M H (IV)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), oder (b) kodiert.

5 3. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 2, weiterhin umfassend eine CDR2-Region, ausgewählt aus

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
DISYSGSTKYKPSLR S (V)
10 kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
VISYDGSNKYYADSVKG (M)
15 kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

20 4. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
25 ATWDDGLNGPV (VII)
kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
AAWDDSLNGWV (VIII)
30 kodierenden Nukleotidsequenz,

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert, und

5 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, weiterhin umfassend eine CDR1-Region ausgewählt aus:

10

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I R S N P V S (IX)
kodierenden Nukleotidsequenz,

15

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I G S N T V N (X)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

20

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 oder 5, weiterhin umfassend eine CDR2-Region ausgewählt aus:

25

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
G S H Q R P S (XI)
kodierenden Nukleotidsequenz,

30

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
S N N Q R P S (XIII)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

- 5 7. Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 enthält.
- 10 8. Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 exprimiert.
- 15
9. Polypeptid,
dadurch gekennzeichnet,
daß es von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 kodiert ist.
- 20
10. Polypeptid nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß es die variable Domäne der H-Kette oder/und die variable Domäne der L-Kette eines humanen Antikörpers umfaßt.
- 25
11. Polypeptid nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sowohl die variable Domäne der H-Kette als auch die variable Domäne der L-Kette umfaßt.
- 30

12. Polypeptid nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mit einer Markierungsgruppe oder einem Toxin gekoppelt ist.
- 5 13. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 9 bis 12.
14. Antikörper nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß er gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten
10 Antikörperkette des Polypeptids gerichtet ist.
15. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponente eine
Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6, einen Vektor nach
Anspruch 7, eine Zelle nach Anspruch 8, ein Polypeptid nach einem
15 der Ansprüche 9 bis 12 oder einem Antikörper nach einem der
Ansprüche 13 oder 14, gegebenenfalls zusammen mit anderen
aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz-
oder Trägerstoffen enthält.
- 20 14. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
eines Vektors nach Anspruch 7, einer Zelle nach Anspruch 8, eines
Polypeptids nach einem der Ansprüche 9 bis 12, eines Antikörpers
nach Anspruch 13 oder 14 oder einer pharmazeutischen Zusammen-
setzung nach Anspruch 15 zur Herstellung eines Mittels für die
25 Diagnose oder für die Behandlung oder Prävention von ATP.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane
5 Autoantikörper gegen Blutplättchen-Membranproteine kodieren, neue
Aminosäuresequenzen von humanen Antikörpern und deren Verwendung für
die Diagnostik und Therapie von Krankheiten.

10

vo 06.06.97 11:54

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: ASAT AG Applied Science & Technology
- (B) STRASSE: Baarerstrasse 77
- (C) ORT: Zug
- (E) LAND: CH
- (F) POSTLEITZAHL: 6302

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Antikoerper

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) BEN ZU SEQ ID NO: 1:

SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 357 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSEL: CDS
- (B) LAGE:1..357

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	48
1	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
		5				10					15				
ACC	TCC	CTC	AAC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	CGC	TCC	ATC	AGT	GGT	TAC	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Asn	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Gly	Tyr
		20				25					30				
TCT	TGG	AGA	TGG	ATC	CGG	CAG	TCT	CCA	GGG	AAG	GGA	CTA	GAG	TGG	ATT
Ser	Trp	Arg	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40					45				
GGG	GAT	ATC	TCT	TAT	AGT	GGG	AGT	ACC	AAG	TAC	AAA	CCC	TCC	CTC	AGG
Gly	Asp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Lys	Pro	Ser	Leu	Arg
	50					55					60				
AGT	CGA	GTC	ACC	CTG	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG
Ser	Arg	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
	65				70					75					80
AAG	CTG	AAT	TCG	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG
Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
		85							90					95	

CGA GTC TTG CCC TTT GAC G ATC TCG ATG GAC GTC TGG GC AAA GGG
 Arg Val Leu Pro Phe Asp Pro Ile Ser Met Asp Val Trp Gly Lys Gly
 100 103 110

336

ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

357

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 119 Aminosuren
- (B) ART: Aminosure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Ser Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Arg Ser Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Ser Arg Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Pro Ser Leu Arg
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Val Leu Pro Phe Asp Pro Ile Ser Met Asp Val Trp Gly Lys Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 333 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTG GTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG CAG TGG GTC
 Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Trp Val
 120 125 130 135

48

ACC	ATC	TCT	TGT	TCT	GGG	AGC	GC	TCC	AAC	ATC	AGA	AGT	AA	CCT	GTT	96
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn	Pro	Val	
				140					145					150		
AGC	TGG	TAT	CAC	CAG	GTC	CCA	GGC	ACG	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TTT	144
Ser	Trp	Tyr	His	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	
			155					160					165			
GGT	AGT	CAT	CAG	CGG	CCC	TCA	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	192
Gly	Ser	His	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
		170					175					180				
AAG	TCG	GGC	ACC	TCC	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	CGT	GGG	CTC	CAA	TCT	GGG	240
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly	
	185					190					195					
GAT	GCT	GGT	GAC	TAT	TAC	TGT	GCA	ACA	TGG	GAT	GAC	GGC	CTC	AAT	GGT	288
Asp	Ala	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	
200				205					210						215	
CCG	GTG	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	AGT	CAG	CCC		333
Pro	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Gln	Pro		
			220					225						230		

(2) .BEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 111 Aminosuren
- (B) ART: Aminosure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Trp	Val	
1				5					10					15		
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn	Pro	Val	
		20					25						30			
	Trp	Tyr	His	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	
		35					40					45				
Gly		His	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
50						55				60						
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly	
65					70					75					80	
Asp	Ala	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	
			85						90					95		
Pro	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Gln	Pro		
		100						105					110			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 369 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLSSEL: CDS
 (B) LAGE:1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
115 120 125	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
130 135 140	
GCT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
145 150 155	
GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG	192
Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
165 170 175	
AAG CGA TTC GCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
180 185 190	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
195 200 205	
GCG AGA GCG CTG GGG AGC TGG GGG GGT TGG GAC CAC TAC ATG GAC GTC	336
Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val	
210 215 220	
TGG GGC AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	369
Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
225 230	

BEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LNGE: 123 Aminosuren
 (B) ART: Aminosure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn T Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 333 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(j) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTG GTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG CAG AGG GTC	48
Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val	
125 130 135	
ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATC GGA AGT AAT ACT GTA	96
Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val	
140 145 150 155	
AAC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACG GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT	144
Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
160 165 170	
AAT CAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC	192
Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
175 180 185	
AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC ATC AGT GGG CTC CAG TCT GAG	240
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu	
190 195 200	
GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA GCA TGG GAT GAC AGC CTG AAT GGT	288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly	
205 210 215	
TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC	333
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	
220 225 230	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 111 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val
1				5					10					15	
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Thr	Val
			20					25					30		
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
		35					40					45			
Ser	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu
65					70					75					80
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
T ₁	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
		100					105					110			